

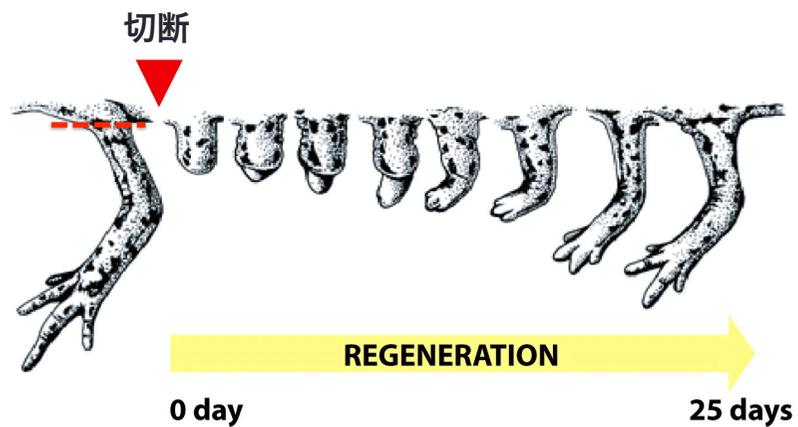
病理学2

組織再生

フロンティア医学研究所組織再生学部門

三高 俊広

イモリ（両生類）の下肢の再生



- ・ 肩の付け根の神経が損傷されれば再生されない

学習項目

1. 組織修復・再生
2. 幹細胞
3. 再生医学

“ヒトの体は再生するだろうか？”

「再生」の定義

形態的にもまた機能的にも、失われた組織と同等に還元されること

平成26年11月19日 病理学2

ヒトの足は再生するか？

NO



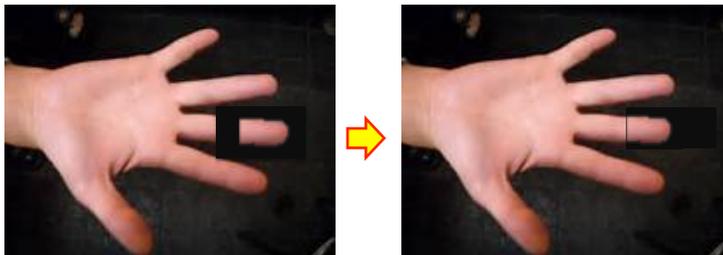
事故により切断した左足

平成26年11月19日 病理学2

ヒトの指の再生

指を切っても

繋ぐことはできる
(機能的に再生することは可能)

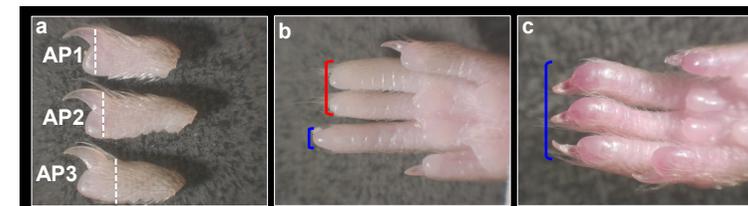


指が生えてくることはない

ヒト(ほ乳類)の指は再生しない、と考えられてきました

平成26年11月19日 病理学2

マウス指先の再生



Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip
Rinkevich Y, Lindau P, Ueno H, Longaker MT, Weisman IL. Nature 476: 409-414 (2011)

A wide range of tissue stem/progenitor cells contribute towards the restoration of the mouse distal digit

AP2-3の部分に様々な組織幹細胞が存在する



平成26年11月19日 病理学2

組織再生

ほ乳類においても条件が整えば組織の再生が起こる可能性がある

ヒトでも再生する臓器・組織がある

肝臓の再生 Liver Regeneration

ギリシア神話の時代

Prometheus

ギリシア神話

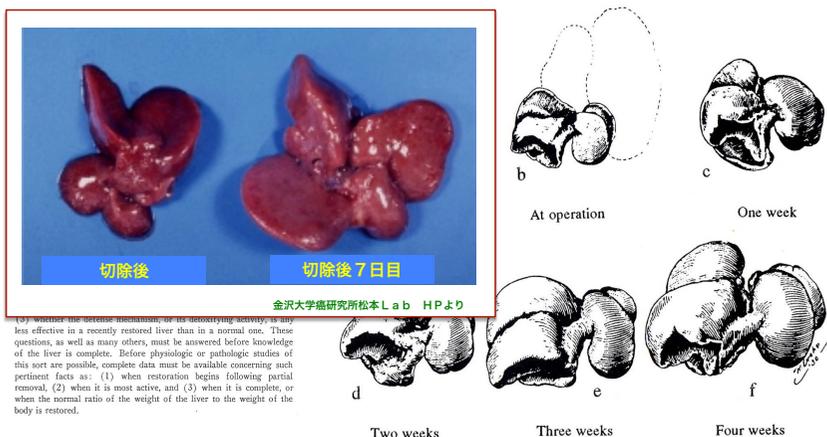
人間に火を与えたことで、Zeusの怒りをかい、コーカサスの山の岩に鎖で繋がれ、永遠に大鷲に肝臓をついばまれる刑に処された。
Prometheusは不死の身であったので肝臓は翌朝には元に戻ってしまう。
死ぬことも出来ず、毎日、永遠に苦しむ。



Prometheus Bound, Peter Paul Rubens (Philadelphia 美術館蔵)

肝再生 Liver Regeneration

ラット2/3部分肝切除 Partial Hepatectomy (PH)



any whether the regenerative activity is any less effective in a recently resected liver than in a normal one. These questions, as well as many others, must be answered before knowledge of the liver is complete. Before physiologic or pathologic studies of this sort are possible, complete data must be available concerning such pertinent facts as: (1) when restoration begins following partial removal, (2) when it is most active, and (3) when it is complete, or when the normal ratio of the weight of the liver to the weight of the body is restored.

恒常性維持—ホメオスターシス (Homeostasis)

ヒトの成体は 約60兆 (6 x 10¹³) 個の細胞からなる

個々の細胞は寿命がある

老いた細胞は死に、分裂によって新しい細胞に置き換わる

ヒトの体の細胞は、数年でほぼ全て入れ替わる

臓器・組織の大きさは、成体では一定 → 再生と細胞死のバランス

老化 → 細胞死 > 新生細胞

臓器・組織の実質細胞数減少 → 臓器・組織の萎縮

ヒト正常組織の再生

・生理的再生系組織 (Physiologically renewal system)

皮膚・毛、小腸、血球

・条件再生系組織 (Conditionally renewal system)

肝臓、結合組織、血管内皮、平滑筋

・非再生系組織 (non-renewal system)

神経細胞、骨格筋、心筋

平成26年11月19日 病理学2

生理的再生系組織 Physiologically renewal system

組織幹細胞 (Stem cells) が細胞を生み出している

- ・皮膚：
 - ・ 約1ヶ月
- ・爪：
 - ・ 0.1 mm/日 再生するのに3-6ヶ月
- ・毛髪：
 - ・ 約10万本 50-100本/日脱毛 2-6年成長
- ・血液：
 - ・ 赤血球 120日
 - ・ 顆粒球 ~2週間
 - ・ T細胞 4~6ヶ月
 - ・ 血小板 10日
- ・小腸：
 - ・ 吸収上皮細胞 2~4日
 - ・ 杯細胞 3~5日
 - ・ Paneth cells 約30日
- ・子宮内膜：
 - ・ 28-30日周期
- ・精子：
 - ・ ~64日

平成26年11月19日 病理学2

条件再生系組織 Conditionally renewal system

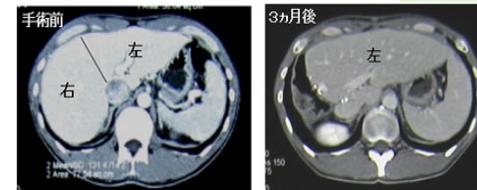
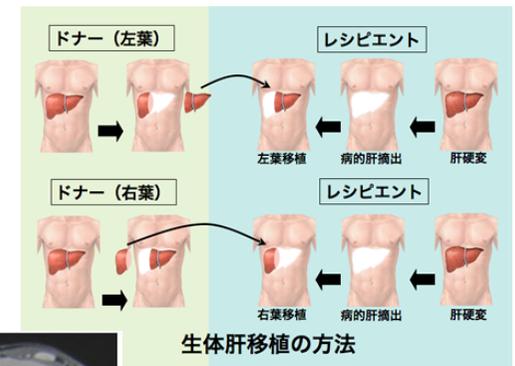
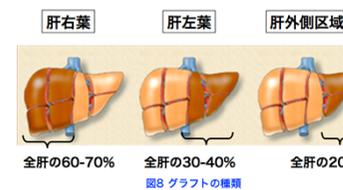
・肝再生 Liver Regeneration

・創傷治癒 Healing of wound

平成26年11月19日 病理学2

ヒト生体肝移植

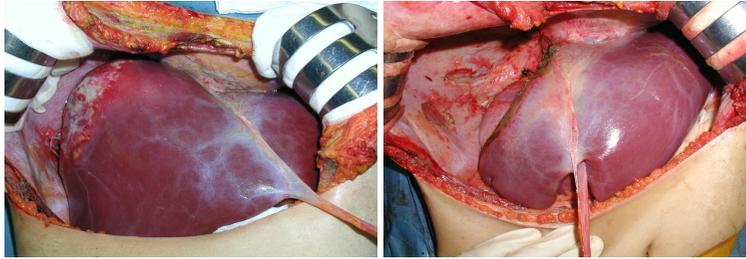
手術方法



<奈良医大HPより>

平成26年11月19日 病理学2

肝臓は再生する臓器



術前

術後1ヶ月

術後5年

平成26年11月19日 病理学2

創傷治癒 Healing of wound

創傷 (Wound) : 体表面や体内臓器組織の損傷又は欠損

創傷治癒
Healing of wound

損傷部位が元の組織と同等に復元するか (再生)、
癒痕(Scar)を残して修復(Repair)される機転

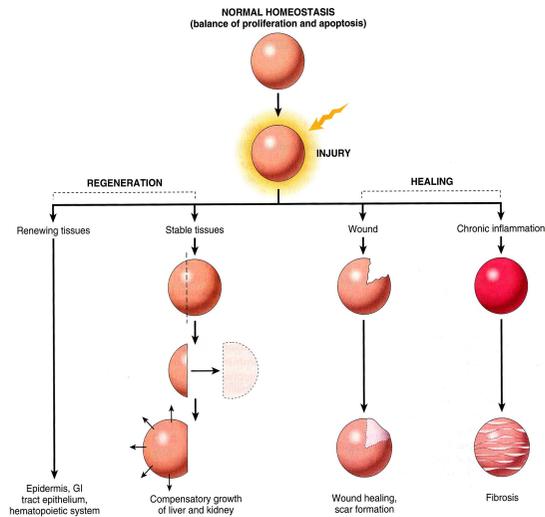
創傷治癒
Healing of wound

- 再生
Regeneration** 形態的にも、また機能的にも失われた組織と同等に復元されること
- 癒痕
Scar** 欠損組織が肉芽組織と (膠原collagen) 線維によって置換されること

*線維: 生体内の繊維については「線維」が使われる

平成26年11月19日 病理学2

再生と修復 (Regeneration and Healing)



平成26年11月19日 病理学2

再生と修復 (Regeneration and Healing)

再生する場合

切創 (手術創)



再生しない場合



やけど後の肥厚性拘縮

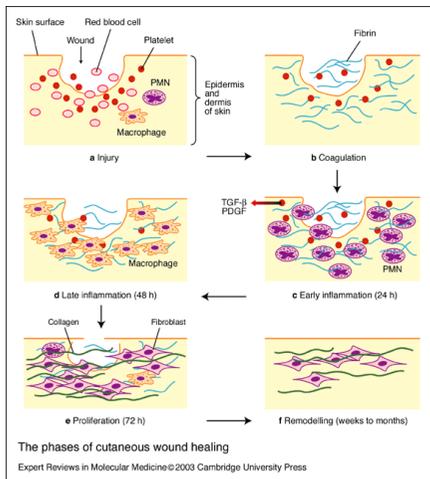


一年後自然治癒

Wound Healing Center Homepageより

平成26年11月19日 病理学2

創傷治癒過程と肉芽組織 Granulation



第一期：炎症反応期

受傷後4, 5日

- 血液凝固により止血し、血小板から放出されたサイトカインにより、白血球、リンパ球、単核球の遊走が起こる
- 単核球が貪食細胞（マクロファージ）になり、放出するサイトカインにより線維芽細胞の遊走を促進する（炎症の四徴）が起こる

第二期：増殖期（肉芽形成期）

受傷後～1, 2週

- 線維芽細胞による膠原線維（コラーゲン）産生
- 毛細血管の発達
- 肉芽組織形成

第三期：安定期

- コラーゲンの産生と分解が平衡化
- 細胞成分の減少
- 癒痕化(Scar formation)

器質化
Organization

平成26年11月19日 病理学2

ケロイド(Keloid)

創傷治癒過程で膠原（コラーゲン）線維が過剰に作られることによって起こる

皮膚から盛り上がった腸詰状、線条状の硬い組織（良性線維増殖性病変）

内因性・外因性：放射線被曝者や若い女性、精巣摘出患者に多い



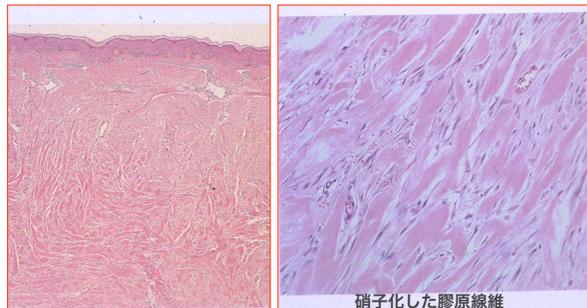
胸部外科手術跡



ピアース跡

平成26年11月19日 病理学2

ケロイド (Keloid)



平成26年11月19日 病理学2

Key Point 1

ヒトの体において

- 正常組織は、その再生の仕方から3つに大別される
 - 生理的再生系組織
 - 条件再生系組織
 - 非再生系組織

- 創傷が治癒する過程には2種類ある。

再生 (Regeneration) と修復(Repair) → 元通りなるか、癒痕(Scar)を残すケロイド (Keloid)形成

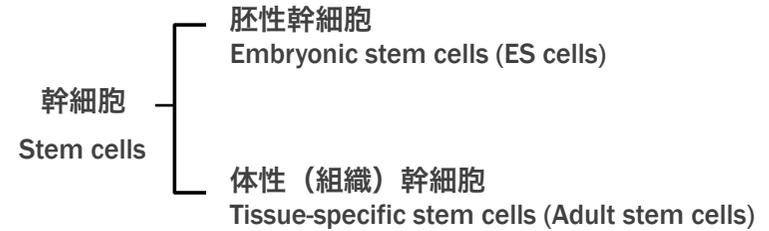
- 創傷治癒は、炎症期、肉芽形成（組織 Granulation）期を経る

- 再生するか否かは、組織と創傷の程度及び治療法による

平成26年11月19日 病理学2

学習項目

1. 組織修復・再生
2. 幹細胞
3. 再生医学



分化の多能性 (方向性)



- 全能性幹細胞 (Pluripotent [totipotent] stem cells)
 - 全ての細胞に分化可能な細胞 (個体を形成できる)
 - ES細胞 Embryonic stem cells
 - iPS細胞 Induced pluripotent stem cells
- 多能性幹細胞 (Multipotent stem cells)
 - 三胚葉性の細胞に分化する能力を持つ細胞
 - 造血幹細胞 Hematopoietic stem cells
 - 間葉系幹細胞 (骨髄、脂肪、臍帯血) Mesenchymal stem cells
 - Muse細胞 (Multilineage-differentiating stress enduring cells)

幹細胞の細胞周期

幹細胞の細胞周期の特徴

造血幹細胞の場合

静止期 (G0-G1) にある

S, G2, M期の細胞: 5%以下
G0期: 75%

Allsopp R, et al. J Exp Med, 193:917 (2001)

幹細胞 (Stem cells)

通常、Dormant な状態



Transit-amplifying (TA) cells

← 実際に増えている幹細胞



前駆細胞 (Progenitor cells)



分化細胞 (Differentiated cells)

平成26年11月19日 病理学2

Key Point 2

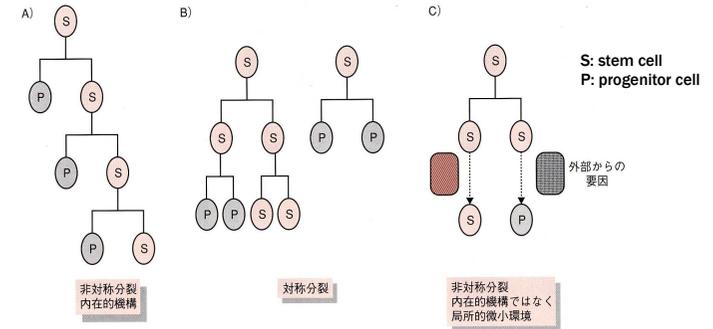
- 幹細胞には、胚性幹細胞と体性（組織）幹細胞がある
- 幹細胞は分化可能な細胞の種類から、全能性、多能性、単能性に分けられる
- 幹細胞は、①自己複製能、②自己保持能、③娘（分化）細胞の供給能、を有する
- (体性) 幹細胞は、静止期にあり、細胞分裂は通常抑制されている

平成26年11月19日 病理学2

幹細胞の分裂様式

幹細胞の特徴

- 未分化能の維持 (自己保持能)
- 自己複製能
- 娘 (分化) 細胞の供給



前駆細胞 (Progenitor cells) : 最終分化した細胞と同様の分化能を持ち、尚かつ多数の娘細胞を生み出せる能力を持つ細胞

平成26年11月19日 病理学2

全能性幹細胞 (Pluripotent stem cells)

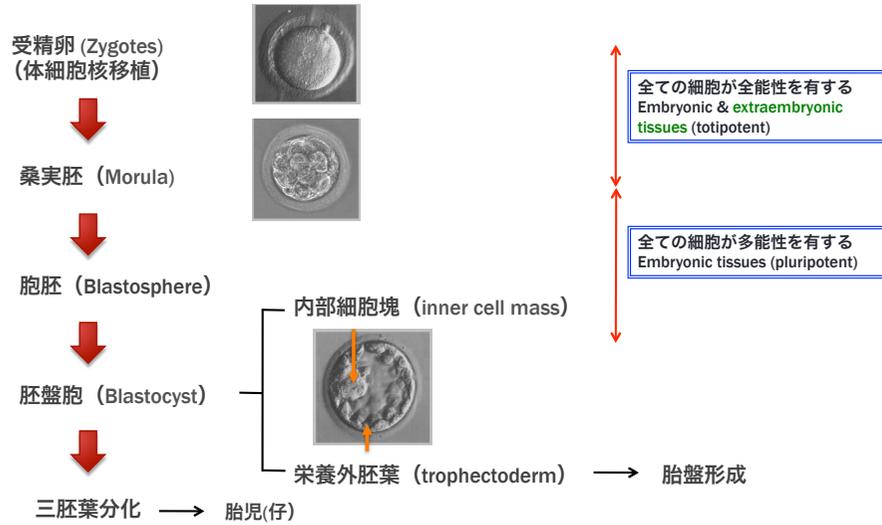
全能性幹細胞
Pluripotent stem cells

ES細胞
Embryonic stem cells

iPS細胞
induced pluripotent stem cells

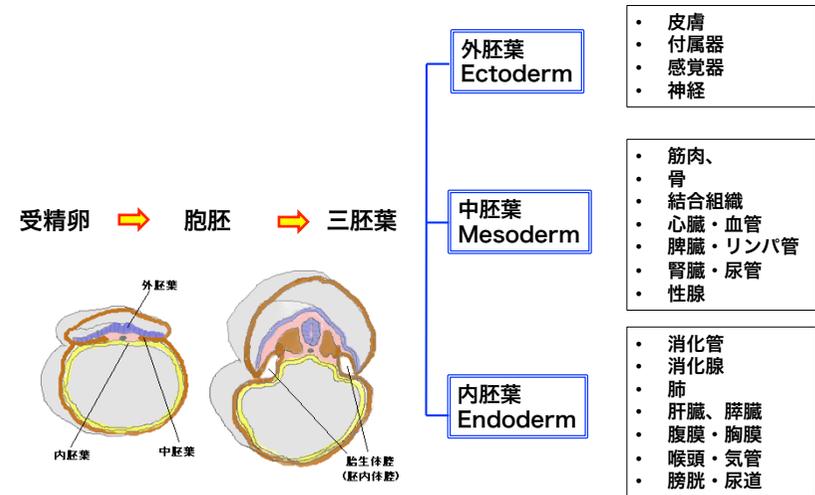
平成26年11月19日 病理学2

胚性幹細胞 - Pluripotent stem cells



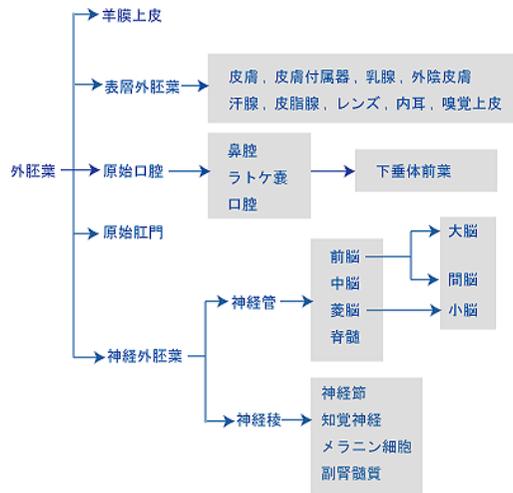
平成26年11月19日 病理学2

三胚葉分化



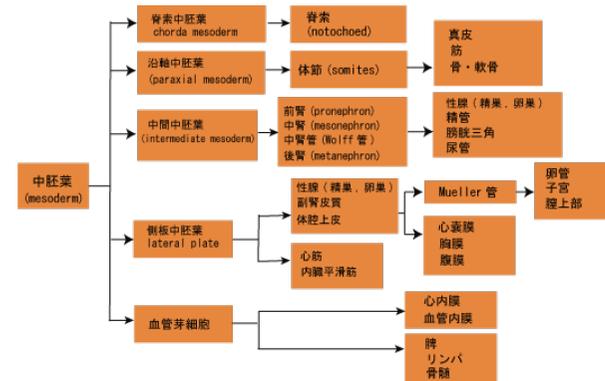
平成26年11月19日 病理学2

外胚葉



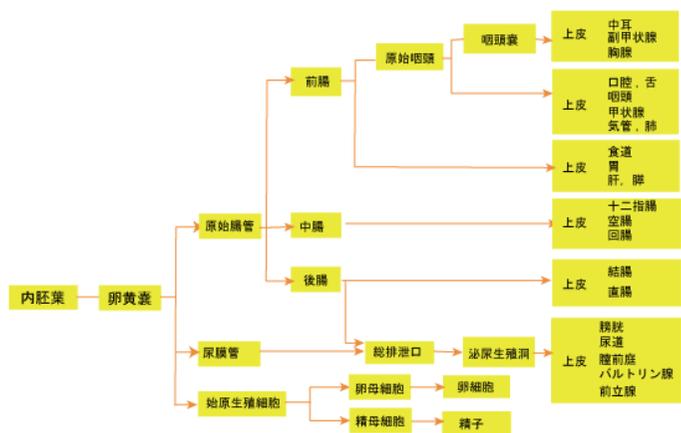
平成26年11月19日 病理学2

中胚葉



平成26年11月19日 病理学2

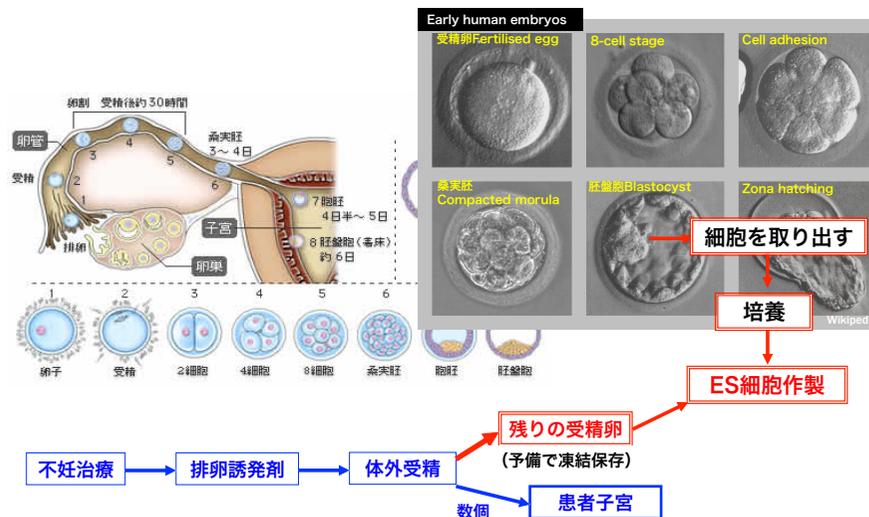
内胚葉



WikiPathologica-PukiWiki
<http://www.ft-patho.net/index.php?WikiPathologicaより>

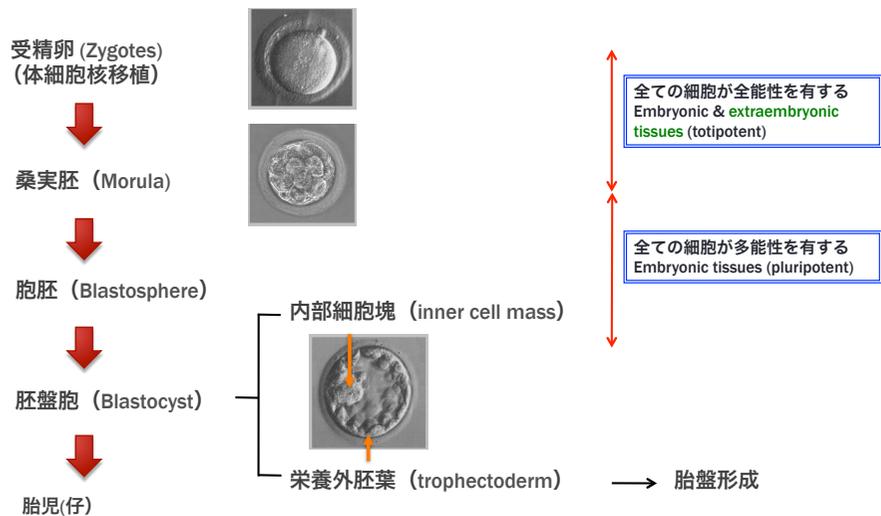
平成26年11月19日 病理学2

ES細胞の樹立方法



平成26年11月19日 病理学2

全能性幹細胞 - Pluripotent stem cells



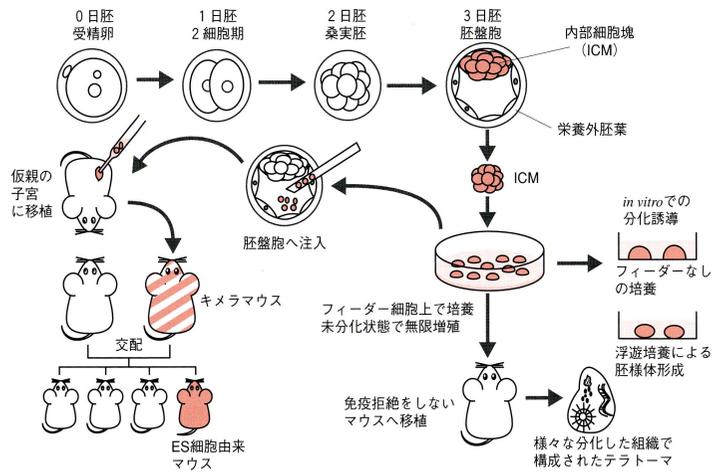
平成26年11月19日 病理学2

細胞が全能性 (Pluripotency) を持つことを示すには?

細胞を胚盤胞 (Blastocyst) に入れると正常発生し、キメラ動物になる

平成26年11月19日 病理学2

ES細胞 (Embryonic Stem Cells)



平成26年11月19日 病理学2

体細胞核移植 - クローン動物の作製

体細胞核移植卵が産仔へ発生する割合
0.1~5%

核の由来	分化の程度	遺伝子の修飾	核移植後の個体への発生能
初期胚	-	-	正常個体
ES細胞	-	- ~ +	正常個体、産後直死
胎仔期生殖細胞	-	+	胎仔期で死滅
分化した体細胞	+	-(?)	形態形成異常、産後直死 正常個体
体性幹細胞	+ or -	-(?)	?

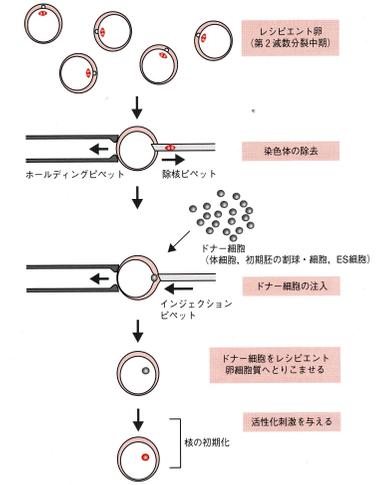
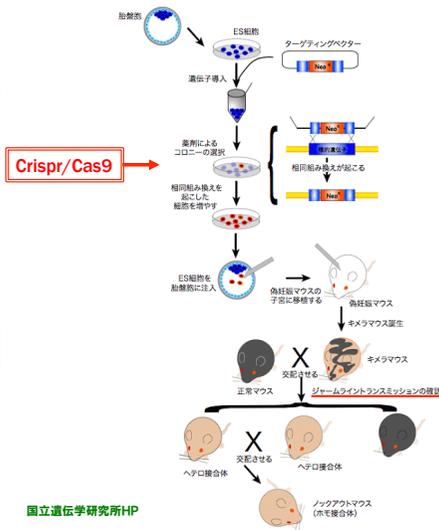


図1 ◆核移植の概略

平成26年11月19日 病理学2

Knockout Mice 作製



平成26年11月19日 病理学2

ヒトES細胞の問題点

・受精卵を破壊する

不妊治療に用いられなかった受精卵を使用する

ヒトES細胞研究における倫理的問題点

- ・ ヒトES細胞の樹立のためには受精卵を使用する
 - 受精卵を提供する夫婦への適切なインフォームドコンセントに関する説明
 - 受精卵の滅失 (ヒトに成長するの可能性をなくすこと) の倫理的問題点
- ・ ヒトES細胞の樹立・分配・使用の徹底的な管理
- ・ 研究の倫理審査等について定めた指針の公開・施行
- ・ 健康なボランティアからの未受精卵の提供の問題

・技術的問題点

ほぼ全てのクローンには何らかの欠陥が見つかったり；テロメア長が短い、エピジェネティック異常

・拒絶反応が起こる

ES細胞由来の細胞は、患者のMHCと異なる可能性が高い

・腫瘍 (奇形腫) 形成の可能性

未分化な細胞を異所に移植すると奇形腫 (Teratoma) が形成される

平成26年11月19日 病理学2

ヒトES細胞の問題点

・腫瘍（奇形腫）形成の可能性

奇形腫 Teratoma

未分化な細胞を本来の組織とは別の部位に移植すると奇形腫 (Teratoma)が形成される



3 胚葉由来の細胞・組織からなる

ヒトの卵巣・精巣腫瘍でよく見られる

全能性幹細胞 (Pluripotent stem cells)

全能性幹細胞
Pluripotent stem cells

ES細胞
Embryonic stem cells

iPS細胞
induced pluripotent stem cells

Induced-Pluripotent Stem Cells – iPS細胞

2006年8月

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2*}
¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan
*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp
DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024

SUMMARY
Differentiated cells can be reprogrammed to an embryonic-like state by transfer of nuclear contents into oocytes or by fusion with embryonic stem (ES) cells. Little is known about factors that induce this reprogramming. Here, we demonstrate induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic or adult fibroblasts by introducing four factors, Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4, under ES cell culture conditions. Unexpectedly, Nanog was dispensable. These cells, which we designated iPS (induced pluripotent stem) cells, exhibit the morphology and growth properties of ES cells and express ES cell marker genes. Subcutaneous transplantation of iPS cells into nude mice resulted in tumors containing a variety of tissues from all three germ layers. Following injection into blastocysts, iPS cells contributed to mouse embryonic development. These data demonstrate that pluripotent stem cells can be directly generated from fibroblast cultures by the addition of only a few defined factors.

INTRODUCTION
Embryonic stem (ES) cells, which are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts, have the ability to give rise to all cell types in the body and the ability to differentiate into cells of the three germ layers (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Human ES cells might be used to treat a host of diseases, such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and diabetes (Thomson

Oct3/4
Sox2
C-Myc
Klf4

体細胞から全能性幹細胞を作ることができた (iPS細胞：人工多能性幹細胞)

2007年11月

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,¹ Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kichiro Tomoda,³ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4*}
¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan
³Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA
⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp
DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019

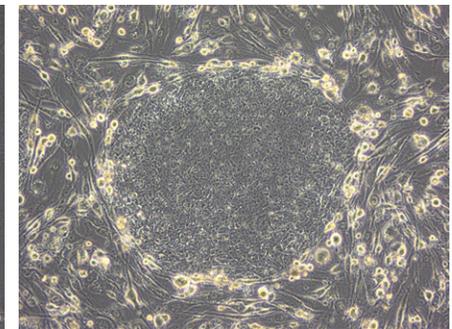
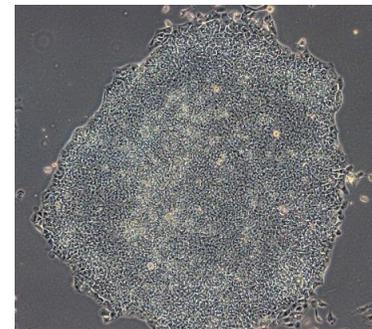
SUMMARY
Successful reprogramming of differentiated human somatic cells into a pluripotent state would

issues is to induce pluripotent status in somatic cells by direct reprogramming (Yamanaka, 2007). We showed that induced pluripotent stem (iPS) cells can be generated from mouse embryonic fibroblasts

ヒトiPS細胞

Human ES cells

Human IPS cells



IPS細胞誕生までの背景

(1) Somatic cell nuclear transfer 体細胞核移植 (Cloning)

未受精卵に体細胞の核を移植すると遺伝子は初期化される

Differentiated cells retain the same genetic information as early embryonic cells

1975: cloned frogs

1996: cloned sheep "Dolly"

(2) Pluripotent stem cell lines such as ES cells の研究が進んでいた

(3) 初期化遺伝子が同定されていた

(4) 転写因子 (transcription factors) が細胞の運命決定の "Master gene"

MyoD (1987): formation of myofibers in fibroblasts

C/EBP α (2004): B & T lymphocytes to macrophages

MafA/Pdx1/Ngn3 (2008): the conversion of pancreatic acinar cells into β -cells

Ascl1/brn2/Myt1 (2010): the conversion of fibroblasts into neuron

Gata4/Mef2c/Tbx5 (2010): the conversion of fibroblasts into cardiomyocytes

平成26年11月19日 病理学2

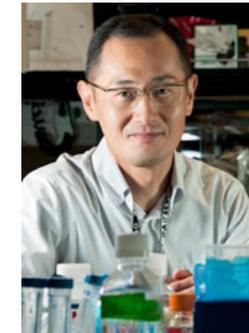
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka

"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



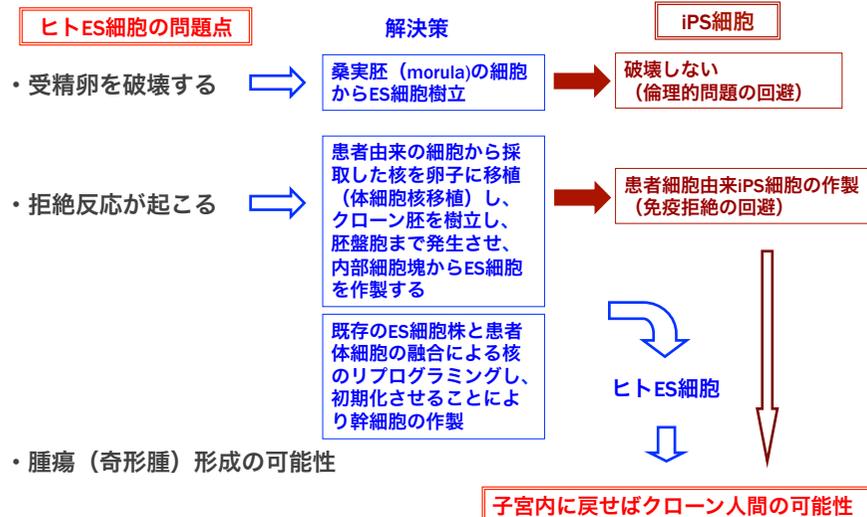
体細胞核移植による
reprogramming



遺伝子による
reprogramming

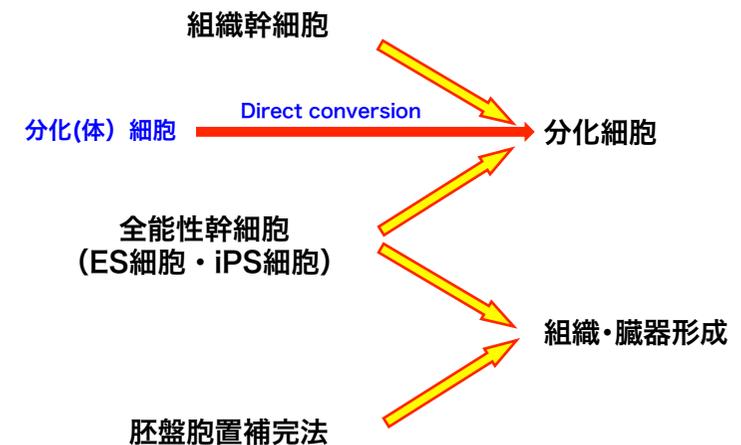
平成26年11月19日 病理学2

IPS細胞が何故これほど期待されるのか？



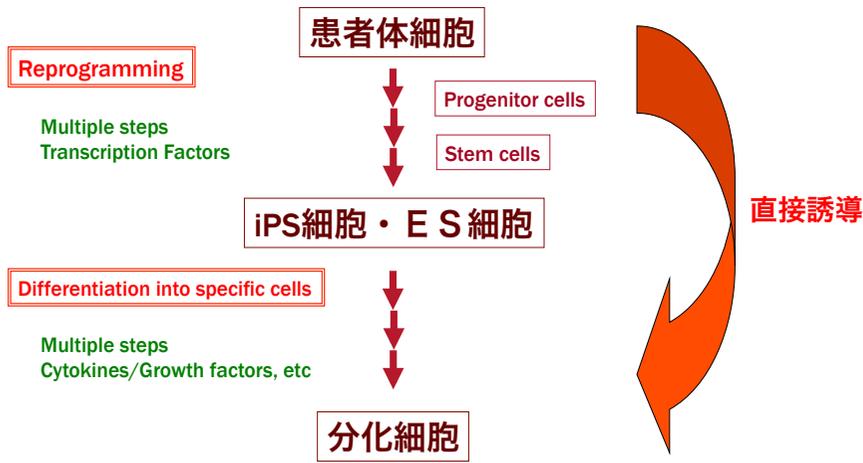
平成26年11月19日 病理学2

再生医療に必要な細胞・組織・臓器形成

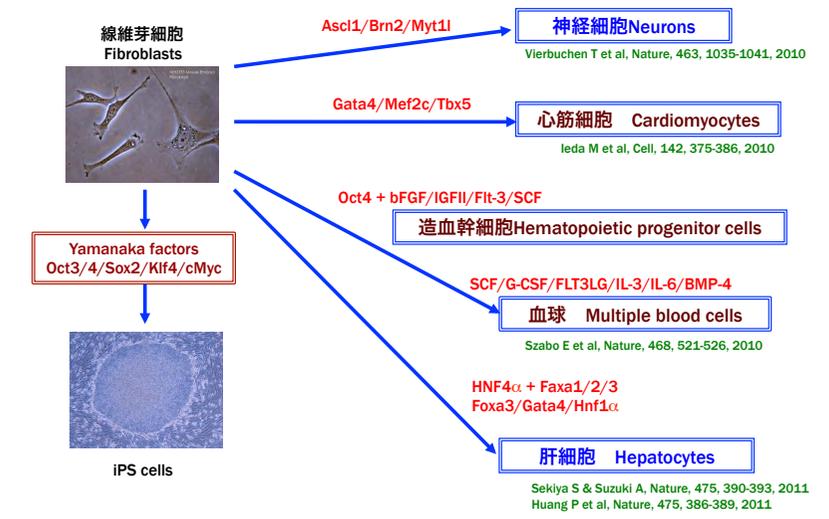


平成26年11月19日 病理学2

再生医療に必要な細胞の調整



Direct Conversions – Transdifferentiation 分化転換



Key Point 4

全能性幹細胞 Pluripotent stem cells

- 全能性を持つ - 全ての組織の細胞に分化可能
- ES細胞、iPS細胞がある
- 再生医療への応用が期待されている
- 胚性幹細胞の利用には克服すべき問題点がある
 - 倫理的問題
 - 技術的問題
 - 腫瘍（奇形腫）形成

幹細胞 (Stem Cells)



ヒト正常組織の再生

- 生理的再生系組織 (Physiologically renewal system)

皮膚・毛、小腸、血球

- 条件再生系組織 (Conditionally renewal system)

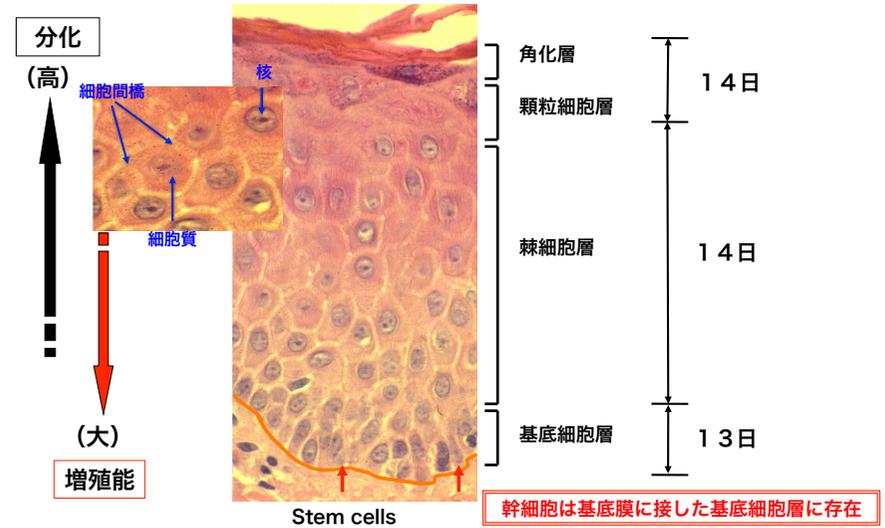
肝臓、結合組織、血管内皮、平滑筋

- 非再生系組織 (non-renewal system)

神経細胞、骨格筋、心筋

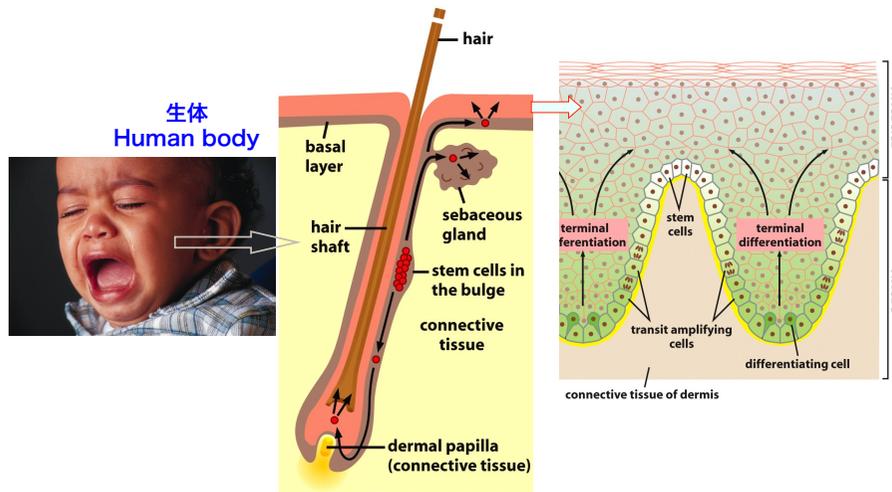
平成26年11月19日 病理学2

生理的再生系組織の再生 — 表皮



平成26年11月19日 病理学2

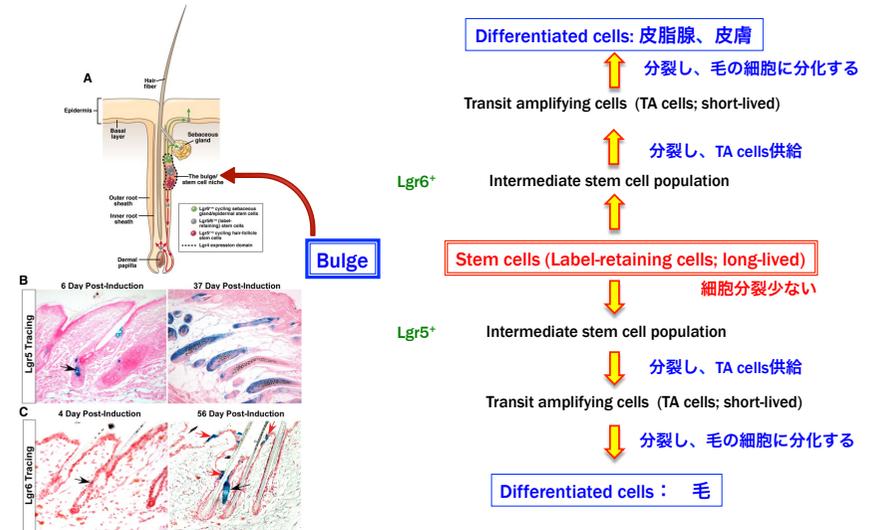
ヒトの皮膚組織



Molecular Biology of the Cell 5th から引用

平成26年11月19日 病理学2

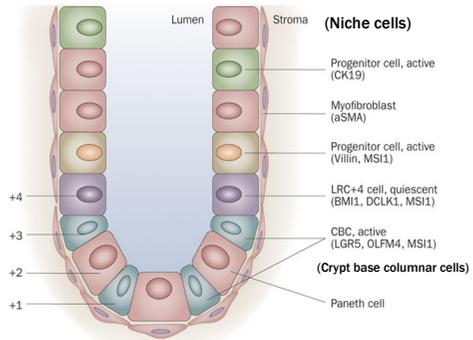
Hair follicleの再生



平成26年11月19日 病理学2

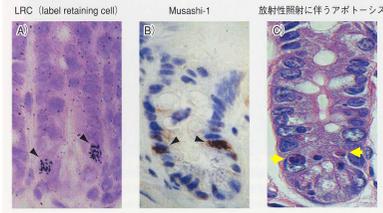
生理的再生系組織の再生 — 小腸

Location of putative intestinal stem/progenitor cells



小腸cryptにおける幹細胞の存在部位

Transit-amplifying (TA) cellsの特徴



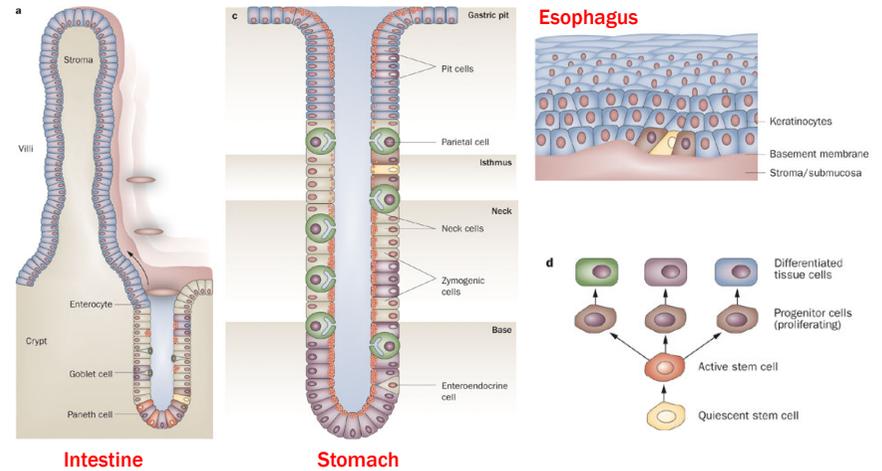
1 division/day

細胞寿命

吸収上皮細胞： 2~4日
杯(Goblet)細胞： 3~5日
Paneth cells： 約30日

Paneth cellsは、nicheとして働いている

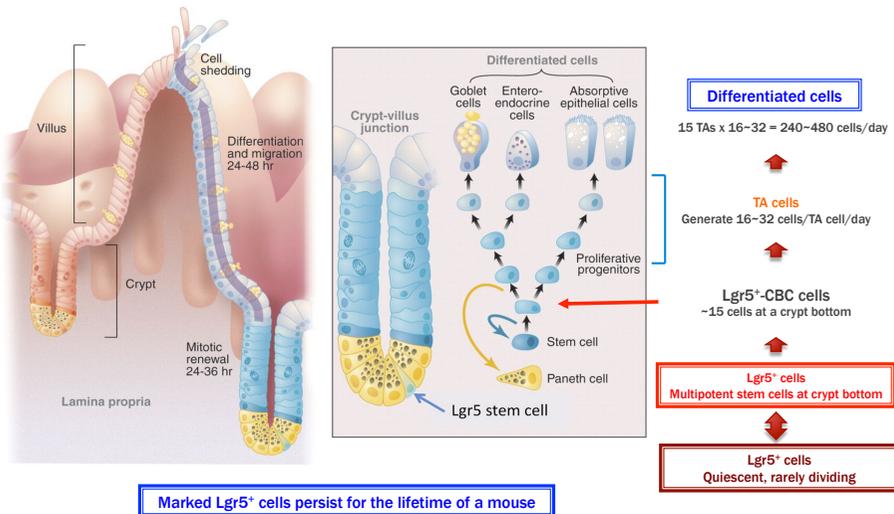
消化管組織における幹細胞の種類と存在部位



Intestine

Stomach

小腸上皮細胞



Marked Lgr5⁺ cells persist for the lifetime of a mouse

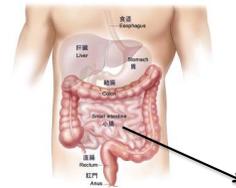
薬の効果と細胞寿命

高血圧症の患者

降圧剤(アダラート)
免疫抑制剤(シクロスポリン)
etc

薬剤の多くは、CYP3A4により代謝され不活化される

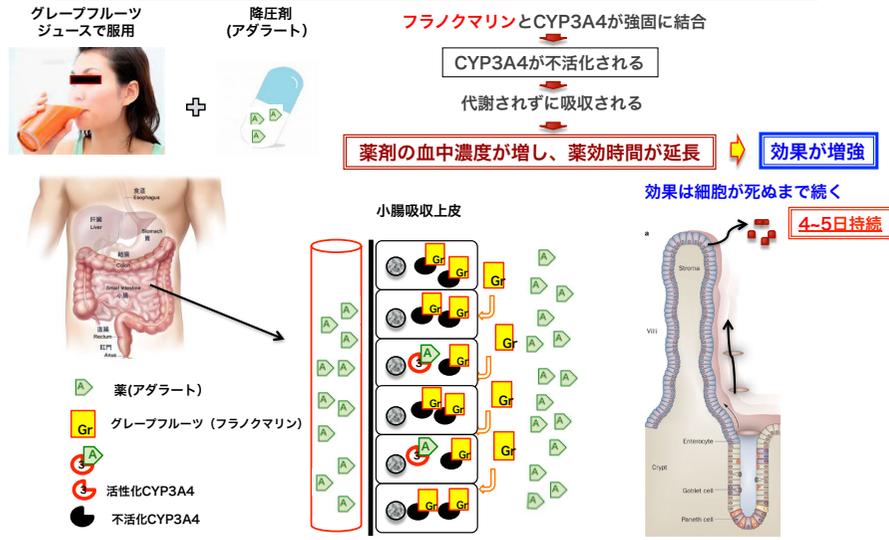
薬剤投与量：最高血中濃度と薬効時間



*一定量が代謝されることを前提としている

A 薬(アダラート)
C CYP3A4
小腸上皮細胞のCYPsの70%を占める
A 不活化された薬

グレープフルーツと細胞寿命



平成26年11月19日 病理学2

生理的再生系組織の再生 — 血球

造血組織

胎児期： 肝臓
成体： 骨髄

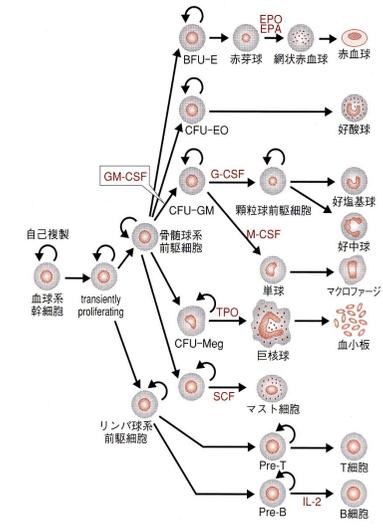
マウス骨髄中の造血幹細胞の頻度：

200 ~ 1000 cells
(<0.1% of CD133⁺ cells)
Long-term quiescent (reserved: backup)
HSCs: 1 division/145 days

造血幹細胞 Actively cycling (primed)

有核細胞
4 x 10⁶ 細胞

赤血球
2.4 x 10⁸ 細胞



平成26年11月19日 病理学2

老化に伴う幹細胞枯渇

115歳で亡くなった女性の献体から判ったこと

Holstege H et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. Genome Res. 2014 May;24(5):733-42.

- 末梢血中の白血球は、たった2個の造血幹細胞由来であった
- 白血球のtelomere長は、脳神経細胞に比較して17倍短かった

Most hematopoietic stem cells may have died from 'stem cell exhaustion,' reaching the upper limit of stem cell divisions."



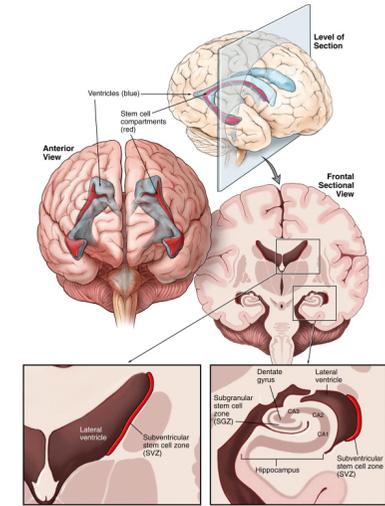
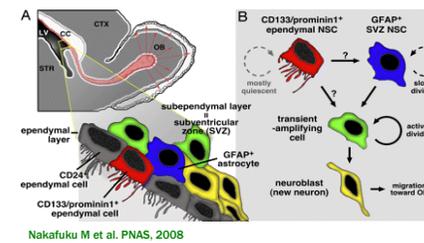
Stem cell exhaustion is a likely cause of death at very old ages?

平成26年11月19日 病理学2

非再生系組織の再生 — 神経

中枢神経系の神経幹細胞

- 海馬歯状回
- 脳室周囲 (側脳室)
- 嗅球

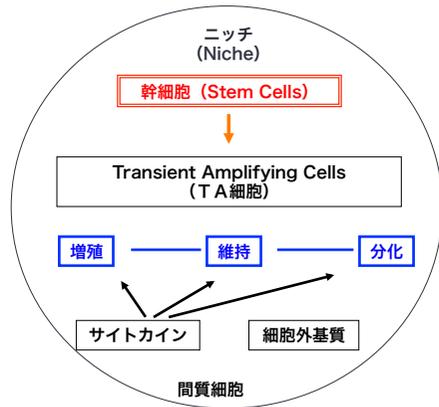


Barani IJ et al. Int J radiat Oncol Biol Phys, 2007

平成26年11月19日 病理学2

ニッチ
(niche)

幹細胞の増殖・分化・維持に必要な環境：サイトカインと間葉細胞
(ストローマ細胞)



体性（組織）幹細胞

- 生理的再生系組織において存在が明瞭
 - 血液、皮膚、消化管において研究が進んでいる
- 通常静止期にあり、非対称分裂によりTA細胞を産生し、TA細胞が分裂し分化細胞を供給する
- 条件再生系組織においても組織の新陳代謝は起こっており、幹細胞も存在するが、分化細胞を供給しているか否か現時点ではよくわかっていない
- 非再生系組織においても幹細胞は存在する
- 幹細胞の増殖・分化・維持に必要な微小環境をニッチ (niche)という